



10/506917

SCHWEIZERISCHE EIDGENOSSENSCHAFT
CONFÉDÉRATION SUISSE
CONFEDERAZIONE SVIZZERA

REC'D 11 MAR 2003

WIPO

PCT

Bescheinigung

Die beiliegenden Akten stimmen mit den ursprünglichen technischen Unterlagen des auf der nächsten Seite bezeichneten Patentgesuches für die Schweiz und Liechtenstein überein. Die Schweiz und das Fürstentum Liechtenstein bilden ein einheitliches Schutzgebiet. Der Schutz kann deshalb nur für beide Länder gemeinsam beantragt werden.

Attestation

Les documents ci-joints sont conformes aux pièces techniques originales de la demande de brevet pour la Suisse et le Liechtenstein spécifiée à la page suivante. La Suisse et la Principauté de Liechtenstein constituent un territoire unitaire de protection. La protection ne peut donc être revendiquée que pour l'ensemble des deux Etats.

Attestazione

I documenti allegati sono conformi agli atti tecnici originali della domanda di brevetto per la Svizzera e il Liechtenstein specificata nella pagina seguente. La Svizzera e il Principato di Liechtenstein formano un unico territorio di protezione. La protezione può dunque essere rivendicata solamente per l'insieme dei due Stati.

Bern,

0 5. März 2003

PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)

Eidgenössisches Institut für Geistiges Eigentum
Institut Fédéral de la Propriété Intellectuelle
Istituto Federale della Proprietà Intellettuale

Patentverfahren
Administration des brevets
Amministrazione dei brevetti

Rolf Hofstetter
Rolf Hofstetter

BEST AVAILABLE COPY

Patentgesuch Nr. 2002 0394/02

HINTERLEGUNGSBESCHEINIGUNG (Art. 46 Abs. 5 PatV)

Das Eidgenössische Institut für Geistiges Eigentum bescheinigt den Eingang des unten näher bezeichneten schweizerischen Patentgesuches.

Titel:
System bzw. Verfahren zur Herstellung rekombinanter Proteine.

Patentbewerber:
ETH Zürich
Rämistrasse 101
8092 Zürich

Vertreter:
OK pat AG Patente Marken Lizenzen
Chamerstrasse 50
6300 Zug

Anmeldedatum: 07.03.2002

Voraussichtliche Klassen: A23L, A61K, C07K, C12N

5

ETH Zürich, Rämistrasse 101, 8092 Zürich

10

E1103-CH

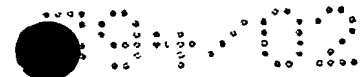
Schweiz

15

System bzw. Verfahren zur Herstellung rekombinanter Proteine

20

Die Glykosylierung stellt eine der wichtigsten post-translationalen Modifikationen von Proteinen in eukaryotischen Zellen dar, sie kann zahlreiche Auswirkungen auf die Funktion und Struktur, die physikalischen Eigenschaften und das Zielverhalten von einzelnen Proteinen haben. Im Allgemeinen werden den Kohlenhydratresten signifikante Effekte in Bezug auf die Struktur und die physiko-chemischen Eigenschaften eines Proteins zugeschrieben. Die Kohlenhydratreste können auch die enzymatische Aktivität, die Antigenizität und die Temperaturstabilität eines Proteins beeinflussen. Die Zucker können über die ϵ -Aminogruppe eines Asparaginrests (*N*-glykosidische Bindung) oder über die Hydroxylgruppe eines Serin- oder Threoninrests (*O*-glykosidische Bindung) an das Protein gebunden sein.



Die *N*-gebundene Proteinglykosylierung ist die bei weitem häufigste in Eukaryoten gefundene Proteinmodifikation und beeinflusst sekretorische Proteine. Der

komplexe-Glykosylierungsprozess beginnt an der zytoplasmatischen Oberfläche

des Endoplasmatischen Retikulums (ER) mit dem Aufbau eines Oligosaccharids

5 auf dem Lipidträger Dolichylpyrophosphat [Burda, P. and Aebl, M. (1999) The dolichol pathway of *N*-linked glycosylation. *Biochim Biophys Acta*, 1426, 239-

257]: Zwei *N*-Acetylglukosamin- und fünf Mannosereste werden schrittweise an dieses Lipid gebunden. Das an Lipide gebundene Oligosaccharid (LLO) wird dann

in das Lumen des ER eingeschwenkt, wo durch die Addition von vier Mannose-

10 und drei Glukoseresten das LLO in seiner ganzen Länge erhalten wird. In der

zentralen Reaktion dieses Prozesses wird das Oligosaccharid auf ausgewählte Asparaginreste der neu synthetisierten Polypeptide transferiert. Diese Reaktion wird

durch die Oligosaccharyltransferase (OTase) im Lumen des ER katalysiert. Die

OTase ist ein Komplex, der aus zumindest acht Untereinheiten aufgebaut ist und

15 dieses Enzym ist für die Ausbildung der *N*-glykosidischen Bindung verantwortlich. Während dem sich das Oligosaccharid des Glykoproteins immer noch im ER be-

findet werden diesem schnell drei Glukosereste und ein Mannoserest entnom-

men. Die Glykoproteine werden dann zum Golgiapparat transportiert, wo eine

weitere Zurechtschneidung und Addition von Zuckerresten erfolgt, bevor die so

20 behandelten Glykoproteine zu ihrem endgültigen Bestimmungsort gelangen [Var-

ki, A., Cummings, R., Esko, J., Freeze, H., Hart, G. and Marth, J. (1999) *Essenti-*

als of Glycobiology. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor,

New York]. Während dem die LLO-Synthese einen hochkonservativen Prozess in

eukaryotischen Zellen darstellt, sind die Modifikationen im Golgiapparat nicht nur

25 Spezies-spezifisch sondern zudem Zelltyp-spezifisch und führen zu einem hohen

Diversifikationsgrad in Bezug auf die Struktur der *N*-gebundenen Oligosaccharide.

Die Produktion menschlicher Proteine bzw. Eiweiße in einer Vielzahl von hetero-

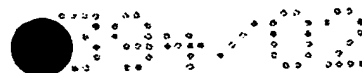
logen Expressionssystemen wurde zu einer wichtigen Technik zur Herstellung

30 rekombinanter Proteine zu Forschungs- und pharmazeutischen Anwendungs-

zwecken. Es ist allgemein anerkannt, dass für diese Produktion kein universelles

Expressionssystem existiert. Zudem hängt die Auswahl eines Zelltyps zur Expres-

sion von heterologen Proteinen von vielen Faktoren ab, welche Zellwachstum-

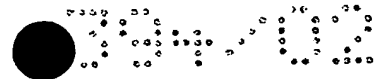


scharakteristika, Expressionspegel, intrazelluläre oder extrazelluläre Expression und die biologische Aktivität des interessierenden Proteins ebenso umfassen wie dessen geplante Verwendung. Eines der wichtigsten der zu beachtenden Kriterien betrifft die Frage, ob ein Protein zu dessen Verwendung glykosiliert sein soll.

- 5 Viele Therapeutika für Menschen sind Glykoproteine und die Bedeutung der post-translationalen Modifikation von Polypeptiden mit definierten Oligosacchariden ist durch deren Einfluss in zahlreichen biologische Phänomenen sehr gut beschrieben.
- 10 Bei in Säugern vorkommenden Glykoproteinen sind die Mehrzahl der *N*-Glykane vom komplexen Typ, sie bestehen aus einem von zwei *N*-Acetylglukosaminen und drei Mannoseresten gebildeten Pentasaccharid-Kern. Dieser Kern ist die aus dem ursprünglichen von Dolichylpyrophosphat an Proteine erfolgten Transfer übrig bleibende Struktur. Er wird im Golgi weiter modifiziert mit Antennen, welche
- 15 zusätzliche *N*-Acetylglukosamin-, Galaktose-, Sialylsäure- und oft Fukosereste umfassen. Dabei ist die Ausbildung einer riesigen Vielfalt von beeindruckend komplexen Oligosaccharidstrukturen möglich. Die Bedeutung von solch komplexen *N*-Glykanen und die grundlegende Funktion dieser Strukturen werden durch Experimente gezeigt, in denen sogenannte "KO"-Mäuse verwendet werden, die
- 20 unfähig sind, solche *N*-Glykane des komplexen Typs zu synthetisieren. Solche Mäuse sterben vor ihrer Geburt. Erst kürzlich wurden kongenitale Störungen der Glykosylierung (congenital disorders of glycosylation = CDG) beim Menschen beschrieben. Diese betreffen eine Gruppe von kongenitalen, multisystematischen Krankheiten, welche durch das Fehlen der Erzeugung von *N*-Glykanen charakterisiert sind. Diese Störungen manifestieren sich durch eine grosse Vielzahl von klinischen Merkmalen, wie z.B. Störungen in der Entwicklung des Nervensystems, psychomotorische Retardierung, Missbildungen, Hypotonie, Koagulationsstörungen und Fehlen von Immunabwehrreaktionen. Das breite Merkmalspektrum widerspiegelt die entscheidende Funktion der *N*-Glykoproteine während der Em-
- 25 brionalentwicklung, Differenzierung und Aufrechterhaltung von Zellfunktionen und betont die Bedeutung der korrekten Oligosaccharidstruktur.
- 30

Da die Mehrzahl der therapeutisch relevanten Proteine in deren natürlichen Formen glykosyliert sind, sollten diese als rekombinante Proteine ebenfalls glykosyliert sein, damit sie die korrekte biologische Aktivität ermöglichen. Aus diesem

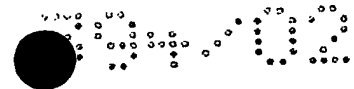
Grunde wird das Steuern des Glykosylierungsmusters in der Qualitätskontrolle von rekombinanten Proteinen immer wichtiger, damit die Produktsicherheit, Wirkung und Konstanz sichergestellt werden kann. Systeme zur Expression von glykosylierten Proteinen wurden entwickelt, dabei werden Zelllinien aus Ovarien des Chinesischen Hamsters (CHO, [Grabenhorst, E., Schlenke, P., Pohl, S., Nimtz, M. and Conradt, H.S. (1999) Genetic engineering of recombinant glycoproteins and the glycosylation pathway in mammalian host cells. *Glycoconjugate Journal*, 16, 81-97.]), Insektenzellen [Altmann, F., Staudacher, E., Wilson, I.B. and Marz, L. (1999) Insect cells as hosts for the expression of recombinant glycoproteins. *Glycoconjugate Journal*, 16, 109-123.] oder Pilzzellen [Malissard, M., Zeng, S. and Berger, E.G. (1999) The yeast expression system for recombinant glycosyltransferases. *Glycoconjugate Journal*, 16, 125-139. or Maras, M., van Die, I., Contreas, R. and van den Hondel, C.A. (1999) Filamentous fungi as production organisms for glycoproteins of bio-medical interest. *Glycoconjugate Journal*, 16, 99-107] am meisten verwendet. Alle diese Zelllinien haben die Fähigkeit Proteine zu glykosylieren (einen grundlegenden Prozess in eukaryotischen Zellen), aber in der Produktion von rekombinanten glykosylierten Proteinen weisen sie grosse Unterschiede auf. Wie oben erwähnt, ist die Synthese der LLO und der Transfer der Oligosaccharide zu Polypeptiden ein hochkonservativer Mechanismus in allen Eukaryoten, wobei die Weiterbearbeitung und das Zurechtstutzen der N-Glykane im Golgi zwischen den Organismen und den Zelltypen variiert. Aus diesen Gründen ist die endgültige Struktur des rekombinanten Glykoproteins durch die zur Produktion verwendete Zelle bestimmt. Normalerweise werden CHO-Zellen zur Expression von rekombinanten Glykoproteinen verwendet. Solche Zellen sind befähigt, N-Glykane des komplexen Typs zu synthetisieren. Einige menschliche, gewebespezifische, endständige Zuckerreste können durch diese Zellen jedoch nicht synthetisiert werden, weil sie nicht die entsprechend notwendigen Glykosyltransferasen exprimieren. Aus diesem Grund müssen die Wirtszelllinien durch das Einfügen von Glykosyltransferasen mittels Genmanipulation verbessert werden.



Insektenzellen werden ebenfalls oft zur Produktion von rekombinanten Proteinen verwendet, weil sie durch eine Infektion mit starken, Baculovirus-basierenden Genexpressionsvektoren befähigt werden, grosse Mengen eines interessierenden Proteins zu synthetisieren. Zudem können sie post-translationale Modifikationen bereitstellen, welche denjenigen von mittels Säugerzellen produzierten gleichen. Der *N*-glykosylierungs-Weg in Insekten verläuft parallel zur Synthese in Säugern bis zur Bildung des Kernpentasaccharids. Normalerweise exprimieren Insektenzellen keine zusätzlichen Transferasen im Golgi, so dass die so produzierten *N*-Glykane verkürzt (paucimannosidisch) vorliegen, anstatt als *N*-Glykane des komplexen Typs, wie er in Säugerzellen gefunden wird.

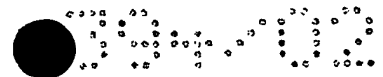
Pilze, im speziellen *Saccharomyces cerevisiae* oder *Pichia pastoris*, sind brauchbare Wirtsorganismen zur Produktion von heterologen eukaryotischen Proteinen. Diese Systeme kombinieren wohlbekannte Techniken zur molekularen und genetischen Manipulation, die Zellen sind leicht zu züchten und sie haben die Fähigkeit zu komplexen post-translationalen Modifikationen, wie z.B. der Proteinglykosylierung. Im Gegensatz zu tierischen Zellen schneiden die Pilze die Oligosaccharide im Golgi nicht weiter zurecht, sondern sie verlängern diese direkt durch das Hinzufügen von Mannoseresten zu Mannanen mit bis zu 200 Mannoseeinheiten. Einige Glykoproteine entziehen diesen Modifikationen und ihre Reifung ist dadurch beschränkter, so dass kurze Oligosaccharide mit bis zu 13 Mannoseresten entstehen.

Diese drei Beispiele der *N*-Glykosylierung in Eukaryoten betonen die Unterschiede in den Strukturen der *N*-Glykane. Die Berücksichtigung der Funktion ergibt, dass eine exakte Analyse der Struktur von grundlegender Bedeutung ist. Signifikante Verbesserungen in der Strukturanalyse von Kohlehydraten wurden in den vergangenen Jahren erzielt. Speziell in der Massenspektrometrie (on-line ESI-MS, nanospray tandem mass spectrometry (ESI-MS/MS) und verbesserten MALDI/TOF-Techniken) wurden sehr empfindliche Instrumente zur Analyse der Glykosylierung zugänglich gemacht.



Die Bedeutung einer hochdefinierten Oligosaccharidstruktur von rekombinanten Glykoproteinen steht in scharfem Gegensatz zur Unfähigkeit heutiger Biotechnologieprozesse, Glykoproteine herzustellen. Diese Unfähigkeit beruht auf der Tatsache, dass die Struktur eines proteingebundenen Oligosaccharids direkt durch den verwendeten Zelltyp vorbestimmt ist und dass alle eukaryotischen Produktionssysteme diese Spezifität zeigen. Es könnte vielleicht möglich sein, eukaryotische Zelllinien mittels Genmanipulation so zu verändern, dass diese eine definierte Oligosaccharidstruktur produzieren. Allerdings macht die Vielzahl der in einem Golgikompartement aktiven Glykosyltransferasen das Erreichen eines solchen Ziels sehr schwierig. Die Verwendung von eukaryotischen Expressionssystemen umfasst folgende zusätzlichen Probleme: Das Expressionssystem von Säugern hat seine Nachteile grundsätzlich in der Verwendung von Zuchtmedien, die Kälberserum enthalten. Hierbei werden, wegen einer möglichen Kontamination mit BSE (bovine spongiforme encephalopathy), oft Bedenken wegen der Biosicherheit geäußert. Zudem sind menschliche Zelllinienkulturen viel schwieriger steril zu halten, diese Zellen wachsen langsam und verlangen teure Kontroll- und Steuerungseinrichtungen. Wie schon erwähnt, hängt das spezifische synthetisierte Glykoprotein direkt von der verwendeten Zelllinie bzw. vom verwendeten Zelltyp ab. Mit anderen Worten, ein rekombiniertes Glykoprotein wird nur mit seinem eigenen *N*-Glykan modifiziert, wenn das heterologe System die entsprechenden ursprünglichen Enzyme des *N*-Glykosylierungswegs exprimiert. Sonst müssen Wirtszellen durch Genmanipulation des Glykosylierungswegs im Golgi (vgl. Fig. 1B) angepasst werden, was den grössten Nachteil bei der Verwendung von menschlichen Zelllinien zur Expression von rekombinanten Glykoproteinen darstellt.

Die Produktion von rekombinanten Glykoproteinen in Insektenzellen unter Zuhilfenahme des Baculovirus-Expressionssystems umfasst folgende Schwierigkeiten: Baculoviren haben grundsätzlich einen lytischen Infektionsmodus, d.h., wenn bei der Ernte der Expressions-Produkte eine grosse Menge von Wirtszellen geöffnet wird, entleeren diese ihre lysierend bzw. degradierend wirkenden Enzyme. Zudem erfolgt die maximale Proteinsynthese kurz vor dem Tod der infizierten Zellen und es muss mit der Möglichkeit gerechnet werden, dass zu diesem Zeitpunkt die



ganze Proteinmodifikation nicht optimal verläuft. Speziell für die Plasmamembran oder zur Ausscheidung bestimmte Proteine werden durch die Zerstörung von Komponenten des post-translationalen Apparats im sekretorischen Weg beeinflusst. Zudem bedeuten Zellkulturen von Insekten im grossen Massstab - wegen des in Bezug auf Säugerzellen erhöhten Sauerstoffverbrauchs und der grösseren Empfindlichkeit der Insektenzellen auf Scherkräfte - eine besondere Herausforderung für einen Biotechnologen. Wie bei Säugerzellen (vgl. oben) liegt der grösste Nachteil der Verwendung von Insektenzellen bei der heterologen Expression von *N*-Glykoproteinen in der unterschiedlichen Struktur des *N*-Glykans. Speziell das Fehlen von terminalen Sialylsäureresten ist von Bedeutung, weil diese Zucker eine wesentliche Rolle in der Glykoproteinbiologie spielen.

Zusammenfassend muss gesagt werden, dass die besprochenen drei eukaryotischen Expressionssysteme im Wesentlichen unfähig sind, Glykane einer gewünschten Struktur herzustellen. Im Gegensatz zu eukaryotischen Systemen bietet das Gram-negative Bakterium *Escherichia coli* einige technische Vorteile für die Produktion von heterologen Proteinen. Es ist das älteste und produktivste System das verwendet wird. Allerdings stellt die Unfähigkeit von *E. coli*, posttranslationale Modifikationen von Proteinen auszuführen, den schwerwiegendsten Nachteil für deren Verwendung als bevorzugten Wirt für die Produktion von menschlichen Proteinen dar.

Die Aufgabe der vorliegenden Erfindung besteht darin, ein System vorzuschlagen, mit welchem rekombinante menschliche oder tierische Proteine, insbesondere *N*-glykosylierte Proteine, herstellbar sind.

Diese Aufgabe wird - gemäss einem ersten Aspekt - mit den Merkmalen des unabhängigen Anspruchs 1 gelöst, indem ein System zur Herstellung rekombinanter menschlicher, tierischer oder pflanzlicher Proteine, insbesondere *N*-glykosylierter Proteine, vorgeschlagen wird, welches dadurch gekennzeichnet ist, dass es einen prokaryotischen Organismus umfasst, in den eine genetische Information, wie z.B. ein Operon, die für einen metabolischen Apparat kodiert, der die geforderte Proteinglykosylierung ausführen kann, eingeführt ist.

Diese Aufgabe wird - gemäss einem zweiten Aspekt - mit den Merkmalen des unabhängigen Anspruchs 7 gelöst, indem ein Verfahren zur Herstellung rekombinanter menschlicher, tierischer oder pflanzlicher Proteine, insbesondere N-glykosylierter Proteine vorgeschlagen wird, das dadurch gekennzeichnet ist, dass eine

5 genetische Information, wie z.B. ein Operon, die für einen metabolischen Apparat kodiert, der die geforderte Proteinglykosylierung ausführen kann in einen prokaryotischen Organismus eingeführt wird.

10 Zusätzliche, das erfindungsgemässe System bzw. das erfindungsgemässe Verfahren weiterbildende Merkmale ergeben sich aus den jeweils abhängigen Ansprüchen.

Vorteile gegenüber aus dem Stand der Technik bekannter Verfahren umfassen:

15

Weil es einfacher ist, mit *E. coli* umzugehen und diese Zellen wachsen zu lassen und weil die Genetik von *E. coli* sehr gut bekannt ist, stellt die Herstellung von menschlichen, tierischen oder pflanzlichen Glykoproteinen in *E. coli* einen Durchbruch in der Biotechnologie dar.

20

Wie zuvor erwähnt, mussten bisher rekombinante Glykoproteine in weniger geeigneten eukaryotischen Systemen hergestellt werden. Obwohl die ersten Schritte in der Synthese von N-Glykoproteinen in allen Organismen in hohem Grade konservativ sind, unterscheidet sich das folgende Zurechtschneiden und

25

Umwandeln ziemlich klar zwischen einzelnen Eukaryoten. Deshalb hängen die N-Glykane von rekombinierten Glykoproteinen von den in den verwendeten Expressionssystemen anwesenden Genen ab, welche die Glykosylierung kodieren.

30

Die Herstellung von rekombinanten Glykoproteinen wird ermöglicht, bei der die neu hergestellten N-Glykane sich in ihrer Struktur von den ursprünglichen N-Glykanen unterscheiden.



Im Gegensatz dazu bietet der Einbau einer genetischen Information - die für einen metabolischen Apparat kodiert, der die geforderte Proteinglykosylierung ausführt, wie z.B. eines Operons - in einen Organismus, der normalerweise keine Proteinglykosylierung ausführt, eine Möglichkeit, die Struktur der zu bildenden N-Glykane zu manipulieren, indem spezifische Glykosyltransferasen eingeführt werden.

Einige im Stand der Technik vorliegenden Probleme sowie das erfindungsgemäße Verfahren werden nun mittels beispielhaften, schematischen Zeichnungen welche den Umfang der vorliegenden Erfindung nicht beschränken sollen - näher erläutert. Dabei zeigen:

- Fig. 1 die Expression von rekombinanten Glykoproteinen in Eukaryoten, wobei
- Fig. 1A die Expression eines Zielglykoproteins, und
- Fig. 1B die Genmanipulation des existierenden Glykosylierungsweges im Golgiapparat darstellt;
- Fig. 2 das Expressionssystem in *Escherichia coli* mit der Expression eines rekombinanten Zielproteins und das erfindungsgemäße Einführen eines spezifischen Glykosylierungswegs; sowie
- Fig. 3 die Legende für die in Fig. 1 und Fig. 2 verwendeten Zeichen für die Glykoproteinreste.

Figur 1 zeigt die Expression von rekombinanten Glykoproteinen in eukaryotischen Expressionssystemen. Figur 1A zeigt die Expression eines Zielglykoproteins, dabei ist der Zusammenbau der an Lipide gebundenen Oligosaccharide (LLO, Schritt I) und der Transfer des Oligosaccharids zum Protein mittels einer OTase (Schritt II) ein hochkonservativer Prozess, der im Endoplasmatischen Retikulum (ER) abläuft. Im Gegensatz dazu erfolgen die Modifikationen der Oligosaccharide im Golgiapparat zellspezifisch (Schritt III).

Figur 1B zeigt ebenfalls die Expression eines Zielglykoproteins in Eukaryoten, dabei ist der Zusammenbau der an Lipide gebundenen Oligosaccharide (LLO, Schritt I) und der Transfer des Oligosaccharids zum Protein mittels einer OTase (Schritt II) ein hochkonservativer Prozess, der im Endoplasmatischen Retikulum (ER) abläuft. Zudem ist der Versuch einer Genmanipulation des existierenden Glykosylierungsweges im Golgiapparat dargestellt. Zu diesem Zweck müssten die Wirtszellen so manipuliert werden, dass ein gewünschtes Glykoprotein erzeugt wird. Die "X"-Zeichen in den schematischen Synthesewegen deuten Deletionen in den entsprechend auszuschliessenden Synthesewegen an. Mit "Asn" ist jeweils ein Asparagin-, mit "PP" ein Pyrophosphat- und mit "SO₄" ein Sulfatrest bezeichnet.

Beide Figuren 1A und 1B zeigen, dass die Expression des rekombinanten Proteins ausserhalb des ER abläuft (Schritt Ib) und dass dieses Zielprotein dann in das ER importiert wird (Schritt IIb). Die Zeichenerklärung für die einzelnen Elemente der Oligosaccharide ergeben sich aus der Legende in Fig. 3.

Um ein rekombinantes Glykoprotein zu erhalten, das eine spezifische Oligosaccharidstruktur aufweist, müsste eine komplexe Veränderung in eukaryotischen Zellen durchgeführt werden, welche grundlegende Stoffwechselwege betrifft und möglicherweise negative Auswirkungen auf die Lebensfähigkeit der Produktionszellen haben könnte. Dies ist beim *E. coli* - System nicht der Fall: Hier wird die Veränderung dadurch erhalten, dass spezifische Komponenten des Glykosylierungsapparates, welche zum gewünschten Glykoprotein führen (Fig. 2), in die Zellen eingeführt werden.

Weil alle grundlegenden Komponenten (Monosaccharide) für den Zusammenbau von Oligosacchariden in *E. coli* Zellen vorhanden sind, erfordert die erfindungsgemäss vorgeschlagene Lösung die Einführung:

- a) von bestimmten Glykosyltransferasen zum Zusammenbau der Oligosaccharide auf einem Lipidträger; und
- b) einer OTase, welche diese Oligosaccharide kovalent an bestimmte Reste des gewünschten Proteins bindet.

Diese Lösung bietet die Möglichkeit, die Oligosaccharidstruktur durch die Expression bestimmter Glykosyltransferasen vorzubestimmen und berührt keine lebenswichtigen Funktionen der Produktionszellen.

5

Figur 2 zeigt das erfindungsgemässe Expressionssystem in *Escherichia coli*, wobei die Expression eines rekombinanten Zielproteins (Schritt Ib) dargestellt ist, welches der Glykoproteinsynthese zugeführt wird (Schritt IIb). Um ein spezifisches Glykoprotein in *E. coli* herstellen zu können, werden spezifische Glykosyltransferasen für den Zusammenbau der an Lipide gebundenen Oligosaccharide (LLO"; Schritt I) in die Wirtszellen eingeführt. Die OTase bindet dieses Oligosaccharid kovalent an spezifische Reste des gewünschten Proteins (Schritt II).

10

15 Beispiel 1

Die Erfindung beruht auf der Erkenntnis, dass *Campylobacter jejuni*, ein Gram-negatives Bakterium Glykoproteine herstellt. Das Gen von *C. jejuni*, welches das Glykoprotein AcrA kodiert, wurde mittels an sich bekannter Methoden in *E. coli* eingeschleust. Dadurch wurde *E. coli* befähigt, nicht-glykosylierte AcrA-Proteine zu produzieren (vgl. Fig. 2, Schritt Ib). Darauf wurde mittels an sich bekannter Methoden ein Operon in *E. coli* eingeführt, welches a) spezifische Glykosyltransferasen und b) eine OTase kodiert. Daraus resultierte die Fähigkeit von *E. coli*, ein spezifisch glykosyliertes AcrA-Protein herzustellen (vgl. Fig. 2, Schritte I und II). Mittels an sich bekannter Methoden wurde diese erfindungsgemäss erzeugte Fähigkeit von *E. coli* verifiziert, indem man an das heterolog hergestellte acrA-Protein hochspezifisch bindendes Lectin Soyabohnen-Agglutinin und glykosylierungsspezifische Antikörper binden liess.

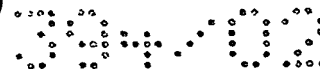
20

25



Patentansprüche

- 5 1. System zur Herstellung rekombinanter glykosylierter Proteine, **dadurch gekennzeichnet, dass** es einen prokaryotischen Organismus umfasst, in den eine genetische Information, die für einen metabolischen Apparat kodiert, der die geforderte Proteinglykosylierung ausführen kann, eingeführt ist.
- 10 2. System nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet, dass** es *N*-glykosylierte Proteine produziert.
- 15 3. System nach Anspruch 2, **dadurch gekennzeichnet, dass** der metabolische Apparat spezifische Glykosyltransferasen zum Zusammenbau der Oligosaccharide auf einem Lipidträger und eine OTase zum kovalenten Binden dieser Oligosaccharide an bestimmte Reste des gewünschten Proteins umfasst.
- 20 4. System nach einem der Ansprüche 1, 2 oder 3, **dadurch gekennzeichnet, dass** der prokaryotische Organismus *Escherichia coli* ist.
- 25 5. System nach Anspruch 3 oder 4, **dadurch gekennzeichnet, dass** der prokaryotische Organismus *N*-Glykane mit einer bestimmten Struktur produziert, welche durch den Typ der spezifischen Glykosyltransferasen bestimmt ist.
- 30 6. System nach einem der vorhergehenden Ansprüche, **dadurch gekennzeichnet, dass** der prokaryotische Organismus neben der genetischen Information, welche für einen metabolischen Apparat kodiert, der die geforderte Proteinglykosylierung ausführen kann, zusätzlich die genetische Information für die Expression eines oder mehrerer rekombinanter Proteine enthält.



7. Verfahren zur Herstellung rekombinanter glykosylierter Proteine, **dadurch gekennzeichnet, dass** eine genetische Information, die für einen metabolischen Apparat kodiert, der die geforderte Proteinglykosylierung ausführen kann, in einen prokaryotischen Organismus eingebaut wird.
- 5 8. Verfahren nach Anspruch 7, **dadurch gekennzeichnet, dass** N-glykosylierte Proteine hergestellt werden.
- 10 9. Verfahren nach Anspruch 8, **dadurch gekennzeichnet, dass** der metabolische Apparat spezifische Glykosyltransferasen zum Zusammenbau der Oligosaccharide auf einem Lipidträger und eine OTase umfasst, wobei die OTase diese Oligosaccharide kovalent an bestimmte Reste des gewünschten Proteins bindet.
- 15 10. Verfahren nach einem der Ansprüche 7 bis 9, **dadurch gekennzeichnet, dass** der prokaryotische Organismus *Escherichia coli* ist.
- 20 11. Verfahren nach einem der Ansprüche 9 oder 10, **dadurch gekennzeichnet, dass** durch Auswahl spezifischer Glykosyltransferasen der prokaryotische Organismus N-Glykane mit einer bestimmten Struktur produziert, welche durch den Typ der ausgewählten Glykosyltransferasen bestimmt wird.
- 25 12. Verwendung des Systems nach einem der Ansprüche 1 bis 6 bzw. des Verfahrens nach einem der Ansprüche 7 bis 11 zur Herstellung von Targets für die Entwicklung von Medikamenten oder zur Produktion von Medikamenten für Menschen, Tiere oder Pflanzen.
- 30 13. Proteine für Ernährungszwecke und/oder pharmazeutische Verwendung, die mit dem System gemäss einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 6 oder nach dem Verfahren gemäss einem oder mehreren der Ansprüche 7 bis 11 hergestellt worden sind.

2002

14. Impfstoffe, Zytokine und dergleichen Medikamente für Menschen, Tiere oder Pflanzen, die mit dem System gemäss einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 6 oder nach dem Verfahren gemäss einem oder mehreren der Ansprüche 7-bis 11 hergestellt worden sind.

5

15. Industrielle Enzyme, speziell konstruierte Nahrungsmittel (insbesondere functional food), Kosmetika, Verpackungsmaterialien oder Textilien, welche Proteine umfassen, die mit dem System gemäss einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 6 oder nach dem Verfahren gemäss einem oder mehreren der Ansprüche 7-bis 11 hergestellt worden sind.

10

Zusammenfassung

- 5 System bzw. Verfahren zur Herstellung rekombinanter glykosylierter Proteine, welches dadurch gekennzeichnet ist, dass es einen prokaryotischen Organismus (z.B. *Escherichia coli*) umfasst, in den eine genetische Information, die für einen metabolischen Apparat kodiert, der die geforderte Proteinglykosylierung ausführen kann, eingeführt bzw. eingebaut ist. Dieser metabolische Apparat umfasst
- 10 bevorzugt spezifische Glykosyltransferasen zum Zusammenbau der Oligosaccharide auf einem Lipidträger und eine OTase zum kovalenten Binden dieser Oligosaccharide an bestimmte Reste des gewünschten Proteins.

15

(Fig. 2)

1 / 2

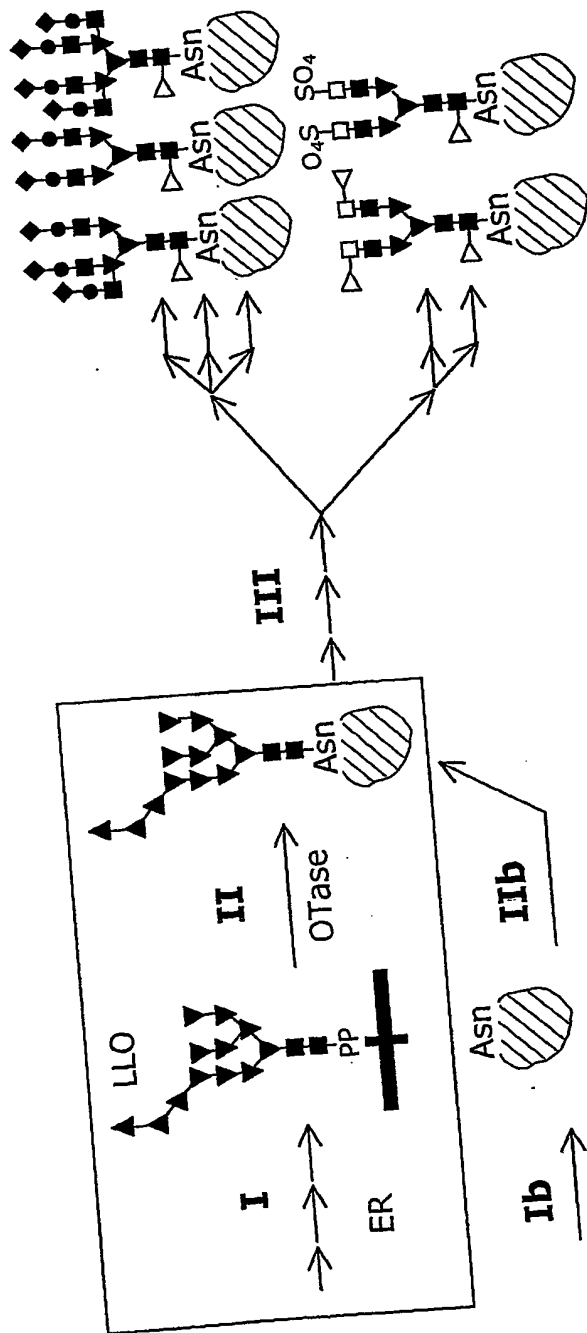


Fig. 1A

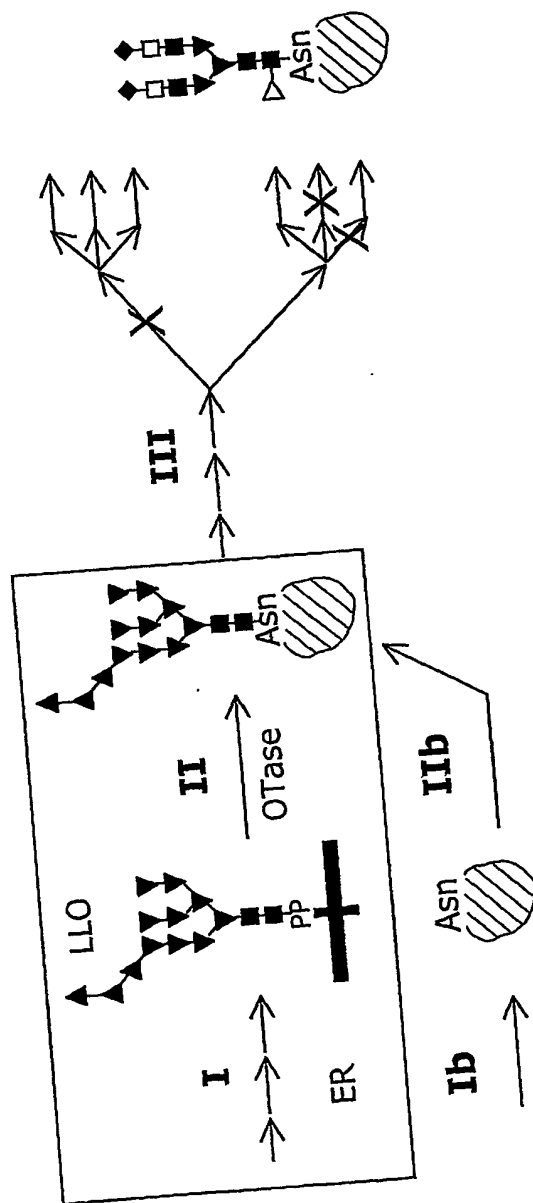


Fig. 1B

2 / 2

Fig. 2

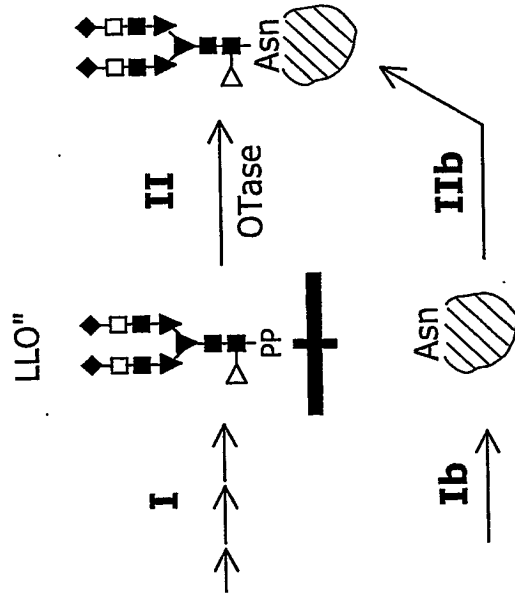
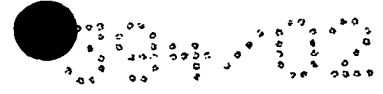


Fig. 3

- N-Acetylglucosamin
- ▼ Mannose
- ▲ Glucose
- △ Fucose
- ◆ Sialylsäure



**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☒ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☒ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.